



Evaluación de la activación plaquetaria en la leucemia linfoblástica aguda

JOSÉ CARLOS JAIME PÉREZ*, VERÓNICA CAMPOS CARTAGENA*, NEREIDA MÉNDEZ RAMÍREZ*,
EDUARDO VÁZQUEZ GARZA*, DAVID GÓMEZ ALMAGUER*

El sistema hemostático es un complejo sistema diseñado y balanceado para mantener el flujo sanguíneo, sellar las superficies dañadas para minimizar pérdidas de sangre y promover la restauración de la arquitectura vascular normal.¹

Las alteraciones en la función plaquetaria están asociadas a condiciones patológicas que conducen tanto a disfunciones tromboembólicas como hemorrágicas. Una activación plaquetaria excesiva causa trombosis, mientras que la activación insuficiente causa hemorragia.² Por esta razón, los estudios de activación y reactividad plaquetaria son relevantes en el conocimiento de la fisiopatología de la hemostasia y en las estrategias terapéuticas,² particularmente en la LLA.

Existe un estado protrombótico en el paciente con cáncer y, particularmente, en las malignidades hematológicas; notablemente, en la leucemia linfoblástica aguda (LLA), las plaquetas pueden estar activadas y participar en el desarrollo de complicaciones trombóticas.³

Función y estructura de las plaquetas

Las plaquetas proceden de los megacariocitos medulares adultos.^{4,5}

En la sangre periférica de sujetos sanos, el número de plaquetas oscila entre 150 y $400 \times 10^9/L$, con una tasa de producción diaria de 5.5×10^7 células/día. La vida media, en sujetos normales, es de 7-10 días, desapareciendo de la circulación por envejecimiento o por consumo en procesos fisiopatológicos.⁵

La etapa de activación es aquella en la cual las plaquetas interaccionan con un inductor primario, como el colágeno contenido en las estructuras subendoteliales o la trombina generada por la activación de la cascada de la coagulación.⁶ La estructura plaquetaria es sumamente compleja y ha sido descrita en detalle.^{7,8}

Desde el punto de vista funcional, las plaquetas contienen gránulos α , gránulos densos y lisosomas, que son liberados al medio extracelular por exocitosis como consecuencia de la estimulación plaquetaria,⁹ y secretan una gran cantidad de sustancias con efectos biológicos, incluyendo el factor plaquetario 4 (PF4), y el PF4 de baja afinidad (LA-PF4), y la β -tromboglobulina (β -TG), los gránulos densos plaquetarios contienen nucleótidos de

*Servicio de Hematología, Departamento de Medicina Interna. Facultad de Medicina y Hospital Universitario.

«Dr. José Eleuterio González» U.A.N.L.

adenina (ADP, ATP), serotonina o 5-hidroxitriptamina, entre otros.¹⁰⁻¹³

Citometría de flujo plaquetaria

Desde que las plaquetas fueron identificadas por primera vez en 1881, ha ocurrido un continuo y lento progreso en nuestro conocimiento acerca de su función.¹⁴ A pesar de que las plaquetas son células fácilmente accesibles para su estudio, si las comparamos con células no circulantes del organismo, existe una notable pobreza de pruebas clínicas útiles para el estudio de su función.¹⁵ Entre los principales métodos utilizados para analizar la función plaquetaria se cuentan los basados en la agregación plaquetaria, los basados en la liberación de productos plaquetarios, los métodos basados en el análisis microscópico y el análisis por citometría de flujo. El análisis de las propiedades funcionales de las plaquetas *ex vivo*, utilizando las técnicas convencionales, como la agregación plaquetaria y la cuantificación de productos liberados por las plaquetas, refleja el comportamiento de la población plaquetaria total en la muestra en estudio. Sin embargo, diferentes poblaciones en la muestra pueden contribuir de forma diferente al resultado global y no es posible discriminarlas.¹⁶

Se han utilizado diversos métodos para evaluar la función plaquetaria.¹⁴⁻¹⁶ Se han empleado técnicas de citometría de flujo (CMF) para su estudio, aunque persisten problemas metodológicos que deben ser resueltos.¹⁷ La CMF puede ser empleada para los siguientes desórdenes plaquetarios: síndromes pretrombóticos, defectos vasculares, defectos congénitos, desórdenes de la función hemostática, monitoreo de terapia antitrombótica plaquetaria, púrpura trombocitopénica idiopática o secundaria a drogas, trombocitopenia auto o aloinmune, entre otras.¹⁸

La CMF proporciona un análisis multiparamétrico de células individuales, constituyendo por ello una técnica extremadamente útil en el estudio de las plaquetas. Hoy es evidente que el análisis de las plaquetas por citometría de flujo es un área de investigación de gran interés y con innumerables aplicaciones clínicas.¹⁶

La citometría de flujo realiza de forma rápida la medición de características específicas de un nú-

mero elevado de células. Antes del análisis citométrico, las células en suspensión son marcadas con un anticuerpo monoclonal fluorescente. En el citómetro, las células suspendidas en fase líquida atraviesan una cámara de flujo a una velocidad de 1,000 a 10,000 por minuto, a través del haz de luz de un láser.

Después de la activación fluorescente del fluoróforo a una determinada longitud de onda, un detector procesa la fluorescencia emitida y las propiedades de dispersión de la luz de cada célula.^{19,20}

En ausencia de un agonista plaquetario exógeno, la CMF en sangre total determina el estado de activación de las plaquetas circulantes, medida por la unión de anticuerpos monoclonales (MoAb), dependientes de su grado de activación. Además del estudio de la función plaquetaria *in vivo*, la inclusión de un agonista exógeno en el ensayo permite el análisis de la reactividad de las plaquetas circulantes *in vitro*.⁵

Las ventajas de la CMF en sangre total son las siguientes: las plaquetas son analizadas directamente en su entorno fisiológico de sangre total, incluyendo glóbulos rojos y blancos, los cuales interfieren con la activación plaquetaria. La mínima manipulación de las muestras previene la activación accidental *in vitro* y la pérdida potencial de subpoblaciones plaquetarias. Se puede estudiar tanto el estado de activación de las plaquetas circulantes como su reactividad. La CMF permite la detección de una amplio espectro de modificaciones en los antígenos de superficie de la membrana plaquetaria, dependientes de la activación de la misma. Además, una subpoblación, tan pequeña como 1% de plaquetas parcialmente activadas, puede ser detectada por este método. Otra ventaja es que se requiere un volumen pequeño de sangre (5.0 µL).²¹

Entre las desventajas de la CMF se cuenta el que sólo mide la función de las plaquetas circulantes.²²

Análisis de la activación plaquetaria *in vivo*

Un proceso trombótico *in vivo*, caracterizado por un aumento del depósito de plaquetas en lugares de lesión vascular o activación endotelial, puede llevar directamente a un número aumentado de

plaquetas activadas en la circulación. Un fenotipo plaquetario activado puede, además, reflejar defectos metabólicos intrínsecos, como ocurre en la diabetes.²³ Para prevenir una activación plaquetaria accidental, que puede ocurrir durante la venopunción, transporte o almacenamiento de la sangre, las muestras de sangre total pueden ser estabilizadas empleando antagonistas de la activación plaquetaria, o usando fijadores en los casos en que la realización del análisis citométrico no es factible en un corto período de tiempo.²⁴

En diferentes situaciones con activación plaquetaria *in vivo*, la fracción de plaquetas circulantes activadas puede ser menor a 1%, existiendo poca información de la sensibilidad de la CMF para detectar la activación plaquetaria de bajo grado.^{25,26}

Análisis de la reactividad plaquetaria *in vitro*

Agonistas estandarizados, como el ADP, permiten una graduación altamente reproducible en la activación plaquetaria *in vitro*. Los ensayos pueden realizarse bajo condiciones no agregantes, en sangre total diluida, permitiendo el análisis de incluso mayor grado de activación plaquetaria, independientemente de las pérdidas celulares selectivas. La inestabilidad plaquetaria limita el análisis de la activación *in vitro*, que requiere acortar lo máximo posible el tiempo desde la venopunción al análisis.^{22,23}

En esta investigación se estudia la hipótesis de que los pacientes con LLA desarrollan un estado hipercoagulable del cual forma parte la activación plaquetaria, lo que se traduce en la expresión de los marcadores de activación CD61 y CD62P. Adicionalmente se determina la capacidad de discriminación de ensayo a bajos niveles de activación de las plaquetas.

Materiales y métodos

El presente estudio fue realizado a un grupo de quince pacientes atendidos por el Servicio de Hematología del Hospital Universitario “José Eleuterio González”, de la UANL, en Monterrey, N. L. Los pacientes son niños con diagnóstico de LLA-B, n=13, LLA-T (n=2), en diferentes etapas de quimioterapia, entre 4 y 17 años de edad. El valor de refe-

rencia de la técnica para el laboratorio en la población estudiada fue establecido investigando un grupo control de 28 individuos sanos, sin ninguna enfermedad aguda o crónica, ingesta de fármacos como el ácido acetil salicílico (AAS), que pudieran afectar a la función plaquetaria en los quince días previos.

Obtención de la muestra. Debido a la alta inestabilidad plaquetaria, la obtención de sangre para el estudio de la activación plaquetaria se debe realizar de una manera cuidadosa y estandarizada. El análisis se realizó con un volumen de 3.0 ml de sangre venosa, de tal forma que se evitara la estasis venosa, es decir, sin la compresión de una ligadura que induciría de antemano la activación preanalítica de las plaquetas. Se desecharon los primeros mililitros porque éstos contienen las plaquetas activadas. Se depositaron en tubos con ACD VACUTAINER® de (Becton Dickinson, San José, CA) previamente etiquetados y con aguja de calibre mayor o igual a 21.

Las muestras se tomaron independientemente del recuento de plaquetas. Asimismo, la muestra de los individuos sanos se obtuvo mediante punción venosa siguiendo los parámetros anteriores. Se rechazaron aquellos individuos en los que la toma de muestra fuera traumática, y los que no tuvieran un ayuno de doce horas previas a la extracción, pues se ha demostrado que la lipemia postprandial eleva la expresión de P-selectina, aunque no afecta a otros marcadores.²⁸

El análisis de sangre total para el estudio plaquetario por citofluorometría (CMF) presenta importantes ventajas con respecto al más tradicional estudio en plasma rico en plaquetas (PRP), ya que, por un lado, el estado de activación plaquetaria está modulado metabólicamente por la presencia de leucocitos y eritrocitos y, por otro lado, para obtener la muestra de PRP se requieren diferentes manipulaciones, entre ellas la centrifugación, que activarán de forma espúrea a las plaquetas. Asimismo, está contraindicado para el estudio plaquetario la presencia de lisis eritrocitaria –empleada para el estudio de otras células por CMF–, ya que la liberación de altas cantidades de ADP induciría una activación plaquetaria espúrea.²⁹

Anticoagulante. El citrato sódico es actualmente

el anticoagulante más empleado para el análisis plaquetario. El EDTA y la heparina deben ser evitados, debido a sus efectos en las glicoproteínas y a la activación plaquetaria espúmea. Además, el EDTA resulta en edema de las plaquetas en un fenómeno dependiente del tiempo, genera cambios en los receptores PIB/i.e. de la superficie plaquetaria.³⁰

El amortiguador salino fosfato (*phosphate saline buffer*-PBS) es el tampón o buffer recomendado para la incubación y lavado de las muestras.

Fijadores. La fijación previene la subsecuente activación plaquetaria artefactual *in vitro*. El paraformaldehído (PFA) a concentraciones de 0.5-1% es el reactivo típicamente empleado en soluciones para la fijación plaquetaria. Hay que tener cuidado para evitar la exposición de plaquetas a altas concentraciones de paraformaldehído, ya que éste es hiperosmolar.³¹ En este estudio se utilizó el PFA a una concentración de 1.0% con un pH de 7.0.

Anticuerpos monoclonales. Debido a que diferentes epítopes reflejan diferentes aspectos de la activación plaquetaria, es preferible emplear un panel de anticuerpos monoclonales (MoAbs), que además permite delinear un perfil de comportamiento correspondiente a la condición patológica en estudio. Los anticuerpos monoclonales son preferibles a los policlonales en estudio en sangre total, ya que pueden saturar de forma eficaz todos los epítopes específicos, y resultan en una menor unión inespecífica. Por tanto, los anticuerpos monoclonales se estandarizan más fácilmente.³² Se eligió el panel de anticuerpos monoclonales producidos por Becton-Dickinson (B-D San José, CA).

Anti-CD61 Anti GPIIIa – o Anti- Integrina β_3 . Este anticuerpo reconoce una proteína de 110 kDa, conocida como GPIIIa, subunidad del complejo GPIIb/IIIa y del receptor de la vitronectina (VNR). Se emplea como marcador panplaquetario, pues se encuentra en la superficie de todas las plaquetas, tanto de las activadas como de aquéllas en reposo. El complejo GPIIb/IIIa, y el VNR son integrinas, es decir, complejos glicoproteicos heterodiméricos que están implicados en la adhesión celular. Con el antígeno CD41 (GPIIb o Integrina α_{IIb}), el antígeno CD61 forma el complejo GPIIb/IIIa, que actúa como receptor para el fibrinógeno, factor de Von Willebrand (vWf),

fibronectina y vitronectina en plaquetas activadas. Con el antígeno CD51 (cadena de la VNR o α_v), el antígeno CD61 forma la VNR que media la adhesión independiente de la activación, de la plaqueta a la vitronectina, vWf, fibrinógeno y trombospodina. El antígeno CD61 se ha descrito en las células endoteliales, megacariocitos y en algunas líneas celulares leucémicas.³³

Anti-CD62P (*P-selectina*). El antígeno 62P es conocido como “platelet activation-dependent granule-external membrana (PADGEM) protein” o proteína de membrana de los gránulos (GMP-140), es un polipéptido de cadena única de 140 kDa. El antígeno CD62P es una proteína de membrana asociada con los gránulos alfa de las plaquetas. Se expresa en el interior de los gránulos alfa en reposo. Una vez que se activa la plaqueta y ocurre la secreción de gránulos, la membrana de los gránulos alfa se fusiona a la membrana plasmática exterior de la plaqueta, y el antígeno CD62P se expresa en la superficie de la misma.³⁴

Anti-PAC-1 (Receptor del Fibrinógeno Activado). Este anticuerpo reconoce como epítopo el complejo glicoproteico GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) de las plaquetas activadas, es decir, el receptor plaquetario para el fibrinógeno. El complejo GPIIb/IIIa es un miembro de la familia de los receptores proteicos adhesivos heterodiméricos, encontrados en una variedad de tipos celulares, denominados integrinas. El GPIIb/IIIa está localizado en la superficie de las plaquetas en reposo. La activación plaquetaria induce un cambio conformacional dependiente de los flujos de calcio, en el GPIIb/IIIa se produce la exposición de un sitio finador de ligandos (LIBS ligand binding site). Cuatro moléculas adhesivas son capaces de interactuar con la forma activada de GPIIb/IIIa: el fibrinógeno, el factor de Von Willebrand (vWf) y la vitronectina.³⁵⁻³⁷

La unión del fibrinógeno al receptor GPIIb/IIIa activado es requerida para la agregación plaquetaria. El PAC-1 se une exclusivamente a plaquetas activadas, reconociendo de forma específica el receptor GPIIb/IIIa activado. Aproximadamente unos 45,000-50,000 receptores GPIIb/IIIa aparecen en la superficie plaquetaria tras su activación. El PAC-1 inhibe la agregación plaquetaria mediada por el fibrinógeno.^{38,39}

RGDS (Arginina-Glicina-Aspartato-Serina). Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) es una secuencia del aminoácido en el fibrinógeno reconocido por receptores GPIIb/IIIa de la plaqueta (GP).⁴⁰ Siendo un antagonista plaquetario de los receptores IIB/IIIa puede causar la activación plaquetaria de manera independiente.³⁹ También, el tetrapeptido, RGDS, de manera competitiva inhibe la fijación de PAC-1. Puesto que PAC-1 es un anticuerpo que reconoce solamente las plaquetas activadas se debe tener cuidado al manipular la muestra.⁴⁰

Selección de fluorocromos. Existen en el mercado anticuerpos monoclonales que ya se encuentran conjugados con un fluorocromo (FITC, PE, PerCP).

Este estudio se basó en las recomendaciones del protocolo de consenso para la caracterización por citometría de flujo de la función plaquetaria,⁴³ empleamos la siguiente combinación de anticuerpos/fluorocromos:

- PAC-1 FITC (isocianato de fluoresceína)
- CD62P PE (ficoeritrina)
- CD61- PerCP (proteína clorofila peridina)

Citómetro de flujo. Para el presente estudio se utilizó un citómetro de flujo FACScalibur™ (Becton-Dickinson®), con dos láseres de argón y diodo rojo, esto permite la utilización de cuatro colores simultáneamente mediante el parámetro de fluorescencia adicional FL-4. El software utilizado fue el CELLQuest™, que permite el análisis cuantitativo de los datos, así como el análisis logarítmico y combinaciones de regiones analizadas. Asimismo, el equipo realiza compensaciones en base a la formación obtenida. Todos los datos de la manipulación permanecen electrónicamente documentados para su análisis y comparación posterior.

Procesamiento de la muestra

El protocolo seguido es una modificación de un método previamente publicado,⁴¹ el cual se seleccionó tomando en cuenta su confiabilidad, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Se realizaron algunas modificaciones de este método de acuerdo a nuestras condiciones de trabajo (tabla I).

El método está diseñado para minimizar la acti-

Tabla I. Protocolo de ensayos de determinación de activación plaquetaria por citometría de flujo en pacientes y controles.

TUBO	Anticuerpo 1	Anticuerpo 2	Anticuerpo 3	Antagonista Plaquetario	Muestra
1	Control de Isotipo IgG-1 PerCP 10 µL	-----	-----	-----	50 µL de sangre sin activar
2	CD61 PerCP 10 µL	-----	-----	RGDS 10 µL	50 µL de sangre sin activar
3	CD61 PerCP 10 µL	CD62P PE 10 µL	PAC-1 FITC 10 µL	RGDS 10 µL	50 µL de sangre sin activar
4	CD61 PerCP 10 µL	CD62P PE 10 µL	PAC-1 FITC 10 µL	RGDS 10 µL	50 µL de sangre activada

vación artificial de las plaquetas durante la recolección de la sangre, brevemente:

- 1) Recolectar 3 ml de sangre completa por venopunción.
- 2) Descartar los primeros 2 ml de sangre porque contiene plaquetas activadas.
- 3) Depositar la sangre en los tubos ACD Vacutainer®, para recolectar sangre completa. Desde que se realiza la extracción de la muestra hasta que se inicia su estudio no deben pasar más de diez minutos.
- 4) Etiquetar tres tubos Falcon de 12x75-mm de poliestireno.
- 5) Añadir 50 µL de ADP (Adenosine diphosphate) 2x10⁻⁴ M (Bio/Data, Inc, Phila, PA, Catalog No. 101312) en un tubo adicional y agregar 0.45 ml de sangre completa citrada, mezclar suavemente, incubar a temperatura ambiente (20 a 25°C) por dos minutos.
- 6) Mezclar suavemente los tubos, sin usar agitación mecánica.
- 7) Incubar de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente (20 a 25°C) en la oscuridad.
- 8) Añadir 1.0 ml de paraformaldehído a 1% en frío a cada uno de los tubos. Mantener las células fijadas a una temperatura de 2 a 8°C en la oscuridad por espacio de dos horas.
- 9) Analizar por citometría de flujo.

Adquisición de datos y análisis

Seleccionar una amplificación logarítmica según las funciones de sus características de *forward scatter* (FSC) y *side scatter* (SSC). En la figuras se pueden

observar los eventos adquiridos con CD61 PerCP, CD62P y PAC-1 con una muestra control de sangre no estimulada con RGDS y estimulada con ADP (figuras 1, 2 y 3).

La finalidad de la citofluorometría plaquetaria en este estudio es la de cuantificar una pequeña población de plaquetas “positivas” por expresar antígenos que están asociados a la activación plaquetaria. Este método presenta la ventaja de tener una alta sensibilidad para la detección de una expresión aumentada de antígenos por parte de una

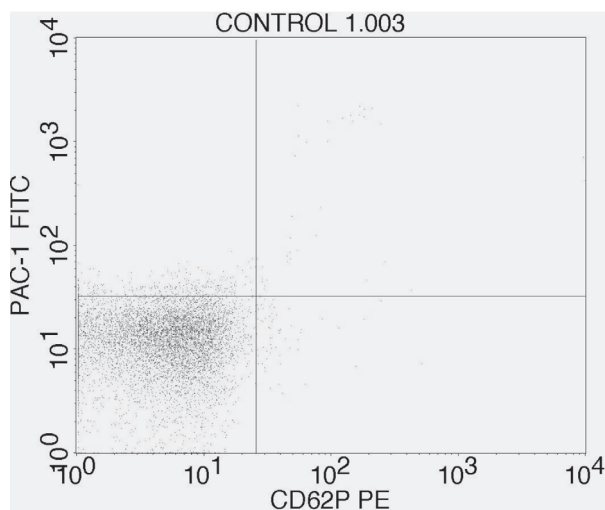
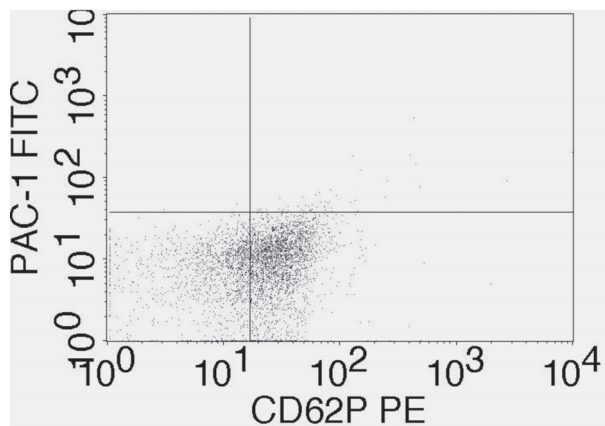


Fig. 1. a) Muestra de sangre control marcada con anti-CD61 PerCP, anti-CD62P PE y anti-PAC-1 FITC no estimulada con RGDS (Arginina-Glicina-Aspartato-Serina), mostrando una activación de 0.33%.



b) Muestra de sangre de paciente con LLA marcada con anti-CD61 PerCP, anti-CD62P PE y anti-PAC-1 FITC no estimulada con RGDS (Arginina-Glicina-Aspartato-Serina). Se demostró activación plaquetaria de 1.2%.

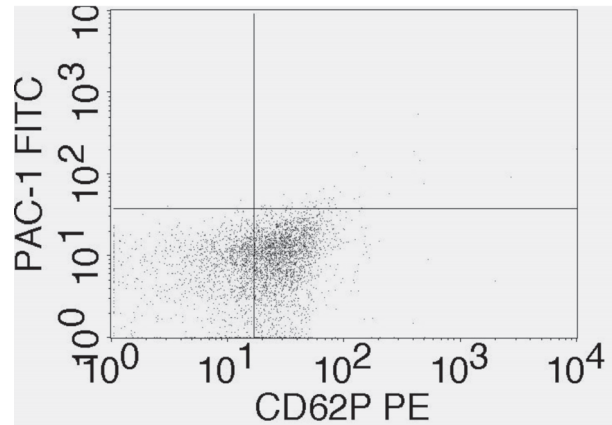
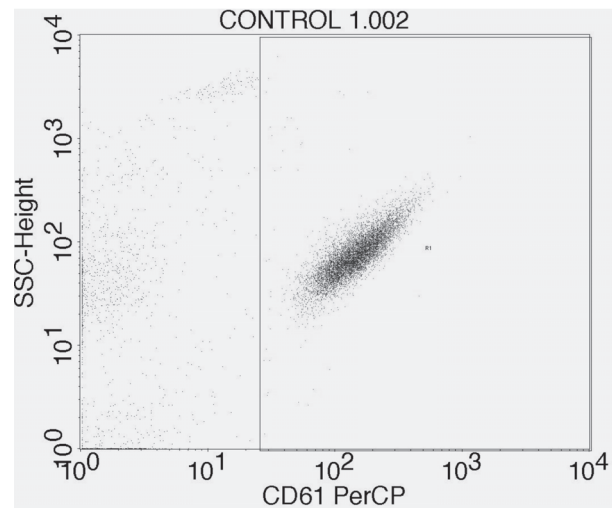


Fig. 2. a) Muestra de sangre periférica de paciente control marcada con anti-CD61 PerCP, anti-CD62P PE y anti-PAC-1 FITC no estimulada con RGDS (Arginina-Glicina-Aspartato-Serina) diferente proyección, mostrando una activación de 0.33%.



b) Muestra de sangre periférica de paciente con LLA, con marcaje CD61 PerCP, CD62P y PAC-1 FITC no estimulada con RGDS (Arginina-Glicina-Aspartato-Serina) en diferente proyección. Se demostró activación plaquetaria de 1.2%.

pequeña subpoblación plaquetaria. Este método de porcentajes de células positivas va de la mano con la intensidad media de fluorescencia (IMF), debido a que se mide el aumento o disminución de expresión de antígenos.

Análisis estadístico

Para tener una interpretación de los resultados cuantitativos analizados, se utilizó el método estadístico U de Mann Whitney, debido a que la mues-

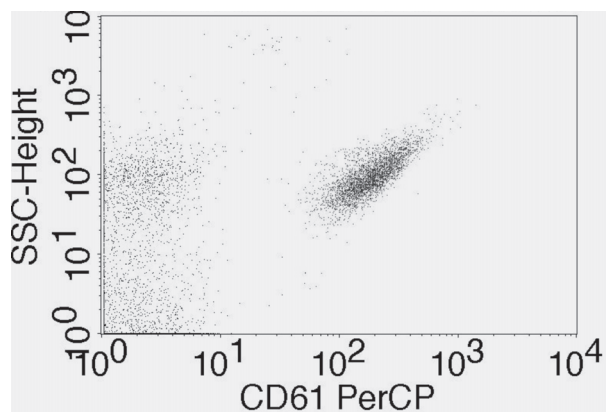
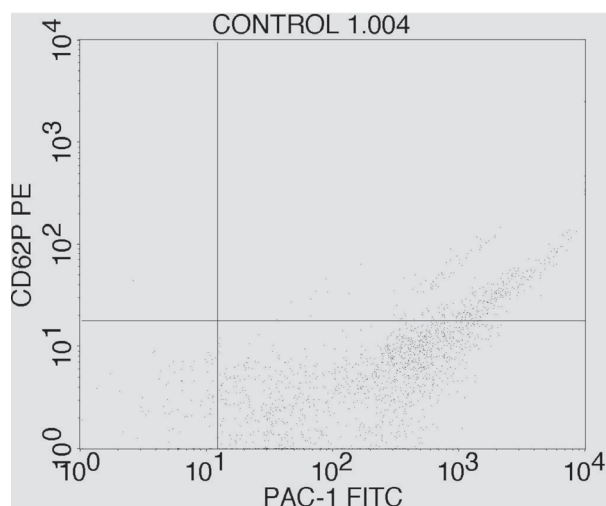


Fig. 3. a) Muestra de sangre control con marcada con anti-CD61 PerCP, anti-CD62P PE y anti-PAC-1 FITC estimulada con ADP, mostrando una activación de 85.8%.



b) Muestra de sangre de paciente con LLA marcada con anti-CD61 PerCP, anti-CD62P PE y anti-PAC-1 FITC estimulada con ADP que muestra una activación de 84.5%.

tra recopilada no siguió una distribución normal. La comparación de dos o más muestras se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) en los casos que siguieron una distribución normal. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS (versión 10.0). Se consideró un resultado como significativo a un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Se estudió un total de quince niños con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA B, $n=13$), LLA de Células T ($n=2$), en diferentes etapas de tratamiento con quimioterapia. Se utilizaron con-

troles sanos para establecer la técnica a seguir, haciendo dos variaciones en ambos grupos, se analizó sangre sin usar ningún activador exógeno, y usando un activador plaquetario, en este protocolo se empleó el ADP.

Cuando se analizaron los resultados de ambos grupos sin estimulación, se observó que el grupo de pacientes con LLA tuvo una activación de 1.2% comparado con 0.33% en el grupo control ($p=0.032$), figuras 1 y 2.

Una vez estimuladas las plaquetas con ADP se obtuvieron los siguientes resultados: el grupo de pacientes con LLA alcanzó una porcentaje de activación de 84.5%, comparado con el grupo control que exhibió una activación de 85.8%, no obteniendo diferencia significativa, $p > 0.05$ (figura 3).

Discusión

La administración de regímenes modernos de quimioterapia para el tratamiento de la LLA de la infancia puede asociarse a complicaciones tromboembólicas significativas, las cuales son más frecuentes durante la etapa de inducción de la remisión. A lo largo del tiempo se han implicado diversos factores en la etiología del estado protrombótico observado en esta población; sin embargo, la administración de la enzima L-asparaginasa de *E. coli* es la que parece ser la principal responsable debido a la comprobada disminución de la biosíntesis de las proteínas anticoagulantes naturales que es capaz de producir,⁴² la cual, además, puede verse complicada por la presencia de factores de riesgo protrombótico heredados.

En esta investigación, que incluyó quince pacientes con LLA en distintas etapas de tratamiento, se documentó una diferencia significativa en el porcentaje de activación plaquetaria del grupo de pacientes estudiados, cuando se comparó con el grupo control de 28 individuos sanos. En general, el grupo de LLA demostró una expresión del marcador de activación plaquetaria CD62P de tres veces el observado en los individuos sanos. Lo anterior refleja un estado de reactividad plaquetaria que podría favorecer el desarrollo de eventos trombóticos, sobre todo si se agregase alguna(s) de las variables protrombóticas adicionales referidas

en los tratados.⁴³

El hecho de que ambos grupos de plaquetas demostraron casi el mismo porcentaje de activación con el estímulo del ADP, sugiere que no existen diferencias iniciales inherentes en las plaquetas del paciente con LLA respecto a las del individuo sano en relación a su capacidad de responder a un estímulo agonista.

Hallazgos adicionales de investigación pudieran contribuir al entendimiento de este particular estado hipercoagulable del niño con LLA, por ejemplo: a) el grupo de investigación ha documentado un claro efecto agonista *in vitro* de la L-asparaginasa en las plaquetas de niños con LLA⁴² planteando la interrogante a la que se pretende dar respuesta en este estudio: puede verificarse *in vivo* el efecto agonista plaquetario de los fármacos empleados en el tratamiento de la LLA; b) la administración usual de vincristina al mismo tiempo que de L-asparaginasa y prednisona induce la apoptosis de linfoblastos malignos, con un índice apoptótico de hasta un 40%.⁴⁴ La apoptosis participa en un numeroso grupo de fenómenos biológicos, incluyendo muy señaladamente la trombogénesis, probablemente a través de la activación del factor tisular.⁴⁵ La apoptosis también puede conducir a la liberación de micropartículas conteniendo factor tisular derivado de la circulación periférica;⁴⁶ c) la formación de complejos heterotípicos potencialmente trombogénicos entre plaquetas y células mononucleares ha sido documentada, por lo que al menos teóricamente es posible la formación de estos complejos entre las plaquetas y los linfoblastos malignos. Al respecto resulta importante el hallazgo de que las plaquetas activadas se unen de manera preferencial a las células mononucleares;⁴⁷ d) existe evidencia experimental de que los trombos pueden ser inducidos por bacterias,⁴⁸ las cuales con gran frecuencia invaden al paciente neutropénico con leucemia en fase de terapia de inducción de la remisión. Algunos de estos factores resultan particularmente importantes, como la compleja interacción de la L-asparaginasa con los anticoagulantes naturales y con los agentes quimioterapéuticos empleados en la LLA, así como la existencia de un *pool* de factor tisular circulante, tal vez accesible a las plaquetas potencialmente activadas *in vivo* como resultado de alguno de los mecanismos descritos.⁴⁶

Este estudio sugiere que las plaquetas en el paciente leucémico pueden ser activadas por una o varias de las diversas circunstancias clínicas y de farmacoterapia que se desarrollan durante esta fase del tratamiento en el niño con LLA, contribuyendo de modo variable al desarrollo de fenómenos trombóticos clínicos o subclínicos.

Resumen

Objetivo. Investigar si los pacientes con LLA desarrollan un estado hipercoagulable con activación plaquetaria. **Material y métodos.** Se incluyeron quince pacientes con LLA de la infancia, trece de tipo B y dos de tipo T. El grupo control consistió de 28 individuos sanos. Ambos fueron estudiados para la expresión de los antígenos CD61 y CD62P por citofluorometría. **Resultados:** El grupo de pacientes con LLA tuvo una activación plaquetaria de 1.2%, comparada con 0.33% en el grupo control ($p=0.032$). **Conclusión:** Existe un aumento significativo en la expresión del marcador de activación CD62P, que podría contribuir al estado protrombótico de la LLA.

Palabras clave: Plaquetas, Citofluorometría, Leucemia linfoblástica aguda.

Abstract

Objective: To determine if platelets from children with ALL become activated at diagnosis. **Material and methods:** 15 children with ALL, 13 type B and 2 type T, were included. The control group consisted of 28 healthy individuals. Both groups were studied for the expression of antigens CD61 and CD62P by cytofluorometry. **Results:** The ALL group had a 1.2% platelet activation, compared to the 0.33% in the control group, ($p=0.032$). **Conclusion:** A significant increase in the surface expression of the activation marker CD62P was demonstrated. This could contribute to the prothrombic state observed in children with ALL.

Keywords: Platelets, Cytofluorometry, Acute lymphoblastic leukemia.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido por parte de la Universidad Autónoma de Nuevo León a través del Programa de Apoyo a la Investigación en Ciencia y Tecnología (Paicyt 2005, proyecto SA1182-05).

Referencias

1. Shatil SJ, Cunningham M, Hoxie J. A. Detection of Activated Platelets in Whole Blood Using Activation- Dependent Monoclonal Antibodies and Flow Cytometry. *Blood* 1987; 307-15
2. Monteiro M, Martínez M., O'Connor J. E. La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas: II. Aplicaciones clínicas. *Rev Diagn Biol*, 2002;51:87-99.
3. Shapiro AD, Trastornos de la función plaquetaria. Tratamiento de la hemofilia, 1999, No. 19
4. Casas A, Salve M, Amich S, Prieto S, Laboratorio de Hematología, Interamericana, McGraw-Hill, pp 177-178. www.tdx.cesca.es/TDX-0218102-105514/-11k
5. García-Allut JL, Estudio de los marcadores de activación plaquetaria en pacientes con sepsis grave y síndrome de disfunción multiorgánica, papel de las interacciones celulares. Tesis presentada en la Universidad Autónoma de Barcelona, diciembre 20 del 2000.
6. Schmitz G., Rothe G., Ruf A., Barlage S., Tshcope D., Clemetson K. J. et al, European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus Protocol for the Flow Citometric Characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998; 79:885-96.
7. White JG. Platelet ultrastructure. In: Bloom AL, Thomas DP, editors. *Haemostasis and thrombosis*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1987. pp. 20-46.
8. Furman MI, Gardner TM, Goldschmidtclermont PJ, Mechanisms of cytoskeletal reorganization during platelet activation. *Thromb Haemost* 1993;70: 229-32.
9. Holmsen H., Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, editors. *Haemostasis and Thrombosis*. Basic principles and clinical practice. 3a. ed. Philadelphia: Lippincott Company; 1994. p. 390-2.
10. Packham MA, Mustard JF. Normal and abnormal platelet activity. In: Lasslo A, editor. *Blood platelet function and medicinal chemistry*. New York: Elsevier Biomedical; 1984. pp. 61-128.
11. Díaz-Ricart M., Escolar G., Ordinas A. Composición química y funciones de las plaquetas. In: Pujol-Moix N, editor. *Trombocitopenias*. Barcelona: Mosby/ Doyma; 1995.p. 11-44.
12. García-Meza M., Coma-Alonso C, Características estructurales y funcionales de las plaquetas, *Rev. Cubana Angiol y Cir. Vasc* 2000; 1:132-41.
13. George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N et al. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during Adult Respiratory Distress Syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 1986;78:340-8.
14. Bizzozzero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e della sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *Osservatore* 1881;17:785-7.
15. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation dependent monoclonal antibodies and flow citometry. *Blood* 1987; 70: 307-11.
16. Monteiro, Martínez M, y O'Connor JE. La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas: II. Aplicaciones clínicas. *Rev. Diagn Biol*. [online]. 2002; 51:3 p.87-99. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.isscii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732002000300001&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0034-7973.
17. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation dependent monoclonal antibodies and flow citometry. *Blood* 1987; 70: 307-11.

18. Cao P C. Clínica Las Condes, Santiago, Chile, Análisis Plaquetario por Citometría de Flujo. www.clinicalascondes.cl/area_academica/Revista_Medica_Octubre_2001/index.htm - 16k -
19. Givan AL. Flow Citometry. First Principles. New York: Wiley -Liss; 1992.
20. Michelson AD. Flow Citometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87: 4925-36.
21. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tshcope D, Clemetson KJ et al, European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus Protocol for The Flow Citometry Characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998; 79:885-96.
22. Shattil S. J., Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow citometry. *Blood* 1987; 70: 307-11.
23. Schmitz G., Rothe G., Ruf A., Barlage S., Tshcope D., Clemetson KJ et al, European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus Protocol for the Flow Citometric Characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998; 79: 885-96.
24. Shattil S. J., Cunningham M, Hoxie J.A. Detection of activated platelets in whole blood using activation dependent monoclonal antibodies and flow citometry. *Blood* 1987; 70: 307-11.
25. Michelson A. D., Barnard MR, Hetchman HB, Macgregor H., Connolly R. J., Loscalzo J. et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface p-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11877-82.
26. Kestin A. S., Valeri CR, Khuri SF, Loscalzo J, Ellis P. A., MaGregor H., et al. The platelet function defect of cardiopulmonary bypass. *Blood* 1993; 82: 107-11.
27. Shattil S. J., Cunningham M, Hoxie J. A. Detection of activated platelets in whole blood using activation dependent monoclonal antibodies and flow citometry. *Blood* 1987; 70:307-11.
28. Bath PMW. The routine measurement of platelet size using sodium citrate alone as the anticoagulant. *Thromb Haemost* 1993; 70:687-90.
29. Schmitz G., Rothe G., Ruf A., Barlage S., Tshcope D., Clemetson KJ et al, European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus Protocol for the Flow Citometric Characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998; 79:885-96.
30. Michelson A. D. Flow Citometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87:4925-36.
31. Becton Dickinson. Monoclonal antibodies detecting human antigens: CD61 (Anti gpIIb, Anti-integrin α -3). 1997. San José, CA, Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Ref Type: Insert.
32. Becton Dickinson. Monoclonal antibodies detecting human antigens: CD62P. 1997. San José, CA, Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Ref Type: Insert.
33. Bennett J. S., Shattil SJ, Power JW, Gartner TK. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor. *J Biol Chem* 1988; 263:12948-12953.
34. Shattil S. J., Weisel J. W., Kieber-Emmons T. Use of monoclonal antibodies to study the interaction between an integrin adhesion receptor, GP IIb-IIIa, and its physiological ligand, fibrinogen. *Immunomethods*. 1993; 1:53-63.
35. Abrams C., Shattil S. J. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thrombosis and Haemostasis*. 1991; 65: 467-473.
36. Shattil S. J., Hoxie JA, Cunningham M, Brass L. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*. 1985; 260: 11107-11114.
37. Shattil S. J., Weisel JW, Kieber-Emmons T. Use of monoclonal antibodies to study the interaction between an integrin adhesion receptor, GP IIb-IIIa, and its physiological ligand, fibrinogen. *Immunomethods*. 1993; 1: 53-63.
38. Tomoko S., Williams C. Kouns Y, Tsutomu Y, Tetra fibrin, a novel non-peptide fibrinogen receptor antagonist, induces conformational

- changes in glycoprotein IIb-IIIa. *Biochem J.* 1994 August 1; 301(Pt 3): 785-791.
39. SIGMA-ALDRICH , <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetails/SIGMA/A9041>
 40. <http://www.cyto.purdue.edu/hmarchiv/1998/0065.htm>
 41. Becton Dickinson. Three-Color Analysis of Platelet Activation. San José, CA, Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Ref Type: Insert.
 42. Jaime-Pérez J. C., Gómez-Almaguer D. Platelet aggregation is stimulated by L-asparaginase in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia and in normal individuals. *Haematologica* 2002;87:891-2
 43. Jaime-Pérez J. C., Gómez-Almaguer D The complex nature of the prothrombotic state in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Haematologica* 2003; 88:(07) ELT 25
 44. Wang J., Weiss I., Svodoba K., Kwaan C. Thrombogenic role of cells undergoing apoptosis. *Br J Haematol* 2001; 115:382-91.
 45. Balasubramanian V., Grabowski E., Bini A., Nemerson Y. Platelets, circulating tissue factor, and fibrin colocalize in ex vivo thrombi: real-time fluorescence images of thrombus formation and propagation under defined flow conditions. *Blood* 2002; 100:2787-92.
 46. Rinder HM, Bonan J.L., Rinder C.S., Ault K.A., Smith BR. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood* 1991; 78:1760-9.
 47. Sjöbring U., Ringdahl U., Ruggeri Z. Induction of platelet thrombi by bacteria and antibodies. *Blood* 2002; 100:4470-7.
 48. Ahmad S. S., London F. S., Walsh N. The assembly of the factor X-activating complex on activated human platelets. *J Thromb Haemost* 2003; 1:48-59.

Recibido: 16 de noviembre de 2006

Aceptado: 13 de marzo de 2007